

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 53 525.6

Anmeldetag: 16. November 2002

Anmelder/Inhaber: Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am
Main, Frankfurt am Main/DE;
Kerckhoff-Klinik GmbH, Bad Nauheim/DE.

Bezeichnung: sCD40L als biochemischer Marker bei kardiovasku-
lären Erkrankungen

IPC: G 01 N 33/53

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 25. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Stech

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

sCD40L als biochemischer Marker bei kardiovaskulären Erkrankungen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Marker für die Aktivierung von Blutplättchen als Werkzeug zur Diagnose von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, deren Prognose und als ein Werkzeug, das die Auswahl von Wirkstoffen zur Behandlung solcher Erkrankungen erleichtert.

Stand der Technik

Eine Thrombusbildung im Koronargefäß ist das auslösende Ereignis einer instabilen koronaren Herzerkrankung. Die zentrale Rolle der Plättchenaktivierung wird bei Patienten mit einer instabilen koronaren Herzerkrankung zusätzlich noch durch Thromboxan- und Prostaglandin-Metaboliten, die von den Plättchen freigesetzt werden, gefördert. Deshalb ist die Plättchenaktivierung ein allgemeines therapeutisches Ziel. Bisher haben derartige Therapien die Verwendung von Aspirin, Thienopyridinen und einem direkten Glycoprotein IIb/IIIa-Inhibitor umfaßt. Allerdings konnte ein zuverlässiger biochemischer Marker der Plättchenaktivierung bis heute nicht identifiziert werden. Ergebnisse mit P-Selektin, dem bisher aussichtsreichsten Marker für eine Plättchenaktivierung, sind bis heute kontrovers.

Inzwischen mehren sich Hinweise darauf, daß das CD40-CD40L-System eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von Patienten mit einer instabilen koronaren Herzerkrankung spielt. Außer in der zellassozierten Form tritt CD40L auch in einer löslichen, biologisch vollständig aktiven Form, nämlich sCD40L, auf. sCD40L wird von stimulierten Lymphozyten abgestoßen und auf Plättchenstimulation hin aktiv freigesetzt. sCD40L wirkt pro-entzündlich auf Endothelzellen und fördert die Koagulation, indem Monozyten und Endothelzellen zur Expression von Gewebefaktoren veranlaßt werden. Darüber hinaus enthält sCD40L eine KGD-Sequenz, ein bekanntes Bindungsmotiv, das für das vorherrschende Plättchen-Integrin α IIb β 3 spezifisch ist. CD40L ist tatsächlich ein α IIb β 3-Ligand, ein Plättchenagonist, und notwendig für die Stabilität von arteriellen Thromben. In Serum von Patienten mit akuten Koronarsyndromen ist eine Erhöhung von sCD40L nachweisbar. Es wurde berichtet (Schonbeck

U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. *Circulation* 2001; 104: 2266-8), daß scheinbar gesunde Frauen, die erhöhte Plasmakonzentrationen an sCD40L aufwiesen, zugleich ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse trugen.

Neuere Befunde zeigen, daß eine Ruptur von Plaques und die anschließende Bildung eines Thrombus bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen zu einer Aktivierung der Exposition von CD40L in zirkulierenden Plättchen führen kann (Lee Y, Lee WH, Lee SC, Ahn KJ, Choi YH, Park SW, Seo JD, Park JE. *Cardiology*. 1999; 92: 11-6). Auch wurden erhöhte Konzentrationen an sCD40L bei Patienten mit Angina nachgewiesen, wobei die Konzentrationen bei Patienten mit instabiler Angina besonders hoch waren (Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L. *Circulation* 1999; 10: 614-20). Diese Befunde legen nahe, daß eine CD40L-CD40-Interaktion eine wichtige Rolle bei der Pathogenese atherosklerotischer Prozesse und der Entwicklung koronarer Syndrome spielt.

Die Etablierung der korrekten Diagnose, verbunden mit einer geeigneten Behandlung von Patienten mit akuten koronaren Syndromen, die nicht mit einer Hebung der ST-Strecke einhergehen, kann sehr mühsam sein. Der Ausschluß von akuten Myokardinfarkten nach heutigen Standards ist nicht zufriedenstellend. In den letzten Jahren hat eine Konzentration auf die Risikostratifizierung und Steuerung der Behandlung stattgefunden mit dem Ziel, Patienten zu identifizieren, bei denen das Risiko besteht, lebensbedrohliche kardiologische Ereignisse zu entwickeln, und die vor allem von verbesserten therapeutischen und intervenierenden Strategien profitieren (Hamm CW, Bertrand M, Braunwald E. *Lancet* 2001; 358:1533-8). Das EKG hat in dieser Hinsicht nur begrenzte prognostische Relevanz, da bedeutende Abnormitäten selten sind und ihr Nachweis wenig empfindlich und spezifisch ist (Kaul P, Fu Y, Chang WC, et al., *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:64-71 und Savonitto S, Ardissino D, Granger CB, et al. *JAMA* 1999; 281:707-13). Deshalb haben sich Marker einer Nekrose von Myokardzellen, vor allem kardiale Troponine, zu wertvollen Werkzeugen bei der Evaluierung von Patienten mit akuten koronaren Syndromen entwickelt (Hamm CW, Braunwald E. *Circulation* 2000; 102:118-22). Troponine sind allerdings nicht aktiv an der Pathophysiologie akuter koronarer Syndrome beteiligt, sondern stellen eher eine Art Surrogat-Marker für die fragile Thrombusbildung dar (Lindahl B, Diderholm E, Lagerqvist B, Venge P, Wallentin L. *J Am Coll Cardio*. 2001; 38:979-86, Heeschen C, van Den Brand MJ, Hamm CW, Simoons ML. *Circulation* 1999; 100:1509-14; Benamer H, Steg PG, Benessiano J, et al.. *Am Heart J* 1999; 137:815-20).

Marker einer Plättchenaktivierung, welche die Aktivität der Erkrankung bestimmen, möglichst bevor eine Myokardnekrose auftritt, könnten wichtige zusätzliche Informationen für die diagnostische und therapeutische Stratifizierung bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen darstellen. In zunehmendem Maße gibt es Beweise dafür, daß auch der CD40-Ligand (CD40L, kürzlich umbenannt in CD154) eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentwicklung und der Plaque-Destabilisierung spielt (Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. *Nature* 1998; 394:200-3 und Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, et al. *Nat Med* 1999; 5:1313-6). Das CD40-CD40L-System ist bei einer Vielzahl von Leukozyten und nicht-leukozytischen Zellen, einschließlich Endothelzellen und glatte Muskelzellen (Schonbeck U, Libby P. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:4-43), sowie aktivierten Plättchen, verbreitet (Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. *Nature* 1998; 391:591-4). Zusätzlich zu der zellassozierten 39-kDa Form tritt CD40L auch in einer löslichen, biologisch vollständig aktiven Form, nämlich sCD40L, auf (Graf D, Muller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. *Eur J Immunol* 1995; 25:1749-54). sCD40L wird von stimulierten Lymphozyten abgestoßen und auf Plättchenaktivierung hin aktiv freigesetzt (Lee Y, Lee WH, Lee SC, et al. *Cardiology* 1999; 92:11-6 und Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. *Blood* 2001; 98:1047-54). sCD40L wirkt pro-inflammatorisch auf Endothelzellen und fördert die Koagulation, indem es die Expression von Gewebefaktoren durch Monozyten (Mach F, Schonbeck U, Bennefoy JY, Pober JS, Libby P. *Circulation* 1997; 96:396-9) und Endothelzellen (Urbich C, Mallat Z, Tedgui A, Clauss M, Zeiher AM, Dimmeler S. *J Clin Invest* 2001; 108:1451-8) induziert. Darüber hinaus enthält sCD40L eine KGD-Sequenz (Graf D, Muller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. *Eur J Immunol* 1995; 25:1749-54), ein bekanntes Bindungsmotiv, das für das vorherrschende Plättchen-Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ spezifisch ist (Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, et al. *J Biol Chem* 1993; 268:1066-73). Es konnte gezeigt werden, daß CD40L tatsächlich einen $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Liganden, einen Plättchenagonisten, darstellt und für die Stabilität arterieller Thromben notwendig ist (Andre P, Prasad KS, Denis CV, et al. *Nat Med* 2002; 8:247-52).

Diese Befunde beweisen zwingend, daß sCD40L eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie akuter Koronarsyndrome spielt. Interessanterweise ist eine Erhöhung von sCD40L im Serum von Patienten mit akuten Koronarsyndromen nachweisbar (Aukrust P, Muller F, Ueland T, et al. *Circulation* 1999; 100:614-20). Es wurde berichtet, daß scheinbar gesunde Frauen, die erhöhte Plasmakonzentrationen an sCD40L aufwiesen, ein erhöhtes Risiko für

kardiovaskuläre Ereignisse trugen (Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Circulation 2001; 104: 2266-8). Ziel der vorliegenden Erfindung ist, den Vorhersagewert von sCD40L-Konzentrationen im Hinblick auf kardiale Ereignisse und die Heilwirkungen des Glycoprotein IIb/IIIa-Inhibitors Abciximab bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen zu untersuchen, wobei die Datenbank der CAPTURE-Studie (c7E3 Anti-Platelet Therapy in Unstable Refractory Angina) verwendet wurde (CAPTURE. Lancet 1997; 349:1429-35).

Ein zuverlässiger biochemischer Marker der Plättchenaktivierung wurde bis heute nicht identifiziert. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wurde sCD40L als ein Marker der Plättchenaktivierung identifiziert und es zeigte sich, daß die sCD40L-Plasmakonzentration wichtige und unabhängige Informationen für die diagnostische und therapeutische Risikostratifizierung bei Patienten mit instabilen koronaren Herzerkrankungen liefert. Ein erhöhtes Risiko von Herzpatienten mit hohen sCD40L-Konzentrationen, die standardmäßig therapiert wurden, wurde durch die zusätzliche Behandlung mit einem Glycoprotein IIb/IIIa-Inhibitor aufgehoben. Die Messung von sCD40L bei Patienten mit instabiler koronarer Herzerkrankung liefert wichtige Einblicke in die Aktivität der Erkrankung, das kardiale Risiko und die Wirkung einer Behandlung mittels Glycoprotein IIb/IIIa-Hemmung durch Abciximab.

Das pro-inflammatorische Zytokin CD40L wird aus aktivierten Plättchen freigesetzt. Die lösliche Form von CD40L, nämlich sCD40L, ist in Patienten mit akuten koronaren Syndromen vermehrt vorhanden. Deshalb wurde der prognostische Wert von sCD40L als ein Marker für die Plättchenaktivierung auch im Hinblick auf die therapeutische Wirkung einer Hemmung des Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptors untersucht.

Base Line-Werte der sCD40L-Konzentration machen Informationen von prognostischem Wert bei Patienten mit akuten koronaren Syndromen unabhängig vom Auftreten einer Myokardnekrose verfügbar. Darüber hinaus läßt sich mittels sCD40L die Hochrisikogruppe von Patienten, welche den größten Nutzen aus einer Anti-Plättchen-Behandlung mit Abciximab ziehen können, identifizieren.

Die vorliegende Studie liefert direkte Hinweise darauf, daß sCD40L ein aussagekräftiger biochemischer Marker einer Plättchen-Aktivierung ist. Eine Erhöhung der Konzentration an CD40L identifiziert zuverlässig eine bestimmte Untergruppe von Patienten mit akuten Koronarsyndromen, die ein hochgradiges Risiko dafür tragen, ein kardiales Ereignis zu erleiden,

und die den größten Nutzen von einer Behandlung mit dem Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten Abciximab haben. Dementsprechend trägt CD40L nicht nur erheblich zu der Pathophysiologie akuter Koronarsyndrome bei, sondern stellt einen zuverlässigen und aussagekräftigen klinischen Marker zur Verfügung, mit dessen Hilfe Patienten mit einer hochrisikoreichen Läsionsbildung und/oder koronaren Thrombose identifiziert werden kann (Andre P, Prasad KS, Denis CV, et al., Nat Med 2002; 8:247-52; Andre P., Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR.; Circulation 2002; 106:896-9).

Bei 40,5% der CAPTURE-Patienten lagen die sCD40L-Konzentrationen in der Zirkulation oberhalb der berechneten Schwellenkonzentration von 5,0 µg/l. Diese Patienten mit erhöhten sCD40L-Konzentrationen trugen ein hochgradiges kardiales Risiko, einen tödlichen oder nicht-tödlichen Myokardinfarkt zu erleiden. Dieses gesteigerte kardiale Risiko bei Patienten mit hohen sCD40L-Konzentrationen, die ein Placebo erhielten, war in besonderem Maße während der ersten 72 Stunden offensichtlich (*Figur 5a*). Allerdings entwickelte sich die Häufigkeit der Ereignisse während der gesamten sechs Monate immer weiter auseinander (*Figur 5b*). sCD40L erwies sich als ein aussagekräftiger prognostischer Marker, der unabhängig vom Nachweis einer Myokardnekrose und unabhängig von den Entzündungsmarkern CRP und TNF- α ebenso wie von dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 ist. In einem Multivarianz-Regressionsmodell lieferten TnT, CRP und sCD40L zuverlässige prognostische Informationen (*Tabelle 2*). Mit Hilfe der sCD40L-Konzentration wurden Patienten ohne Anzeichen einer Myokardnekrose identifiziert, die ein erhöhtes kardiales Risiko aufwiesen. Unter Verwendung festgesetzter Schwellenkonzentrationen für TnT und CRP sowie einer Einteilung der Patienten anhand der Anzahl kardialer Marker, die erhöht waren, wurde festgestellt, daß eine simultane Abschätzung dieser drei pathobiologisch unterschiedlichen biochemischen Marker zum Zeitpunkt, zu dem der Patient vorstellig wird, eine aussagekräftige Vorhersage des Risikos des Patienten, nachteilige kardiale Ereignisse während der nachfolgenden sechs Monate zu erleiden, ermöglichte.

Troponine stellen Marker einer Myokardnekrose dar, sind jedoch nicht aktiv in die Pathophysiologie akuter Koronarsyndrome involviert. Sie sind eher Surrogat-Marker für die fragile Thrombus-Bildung (Lindahl B, Diderholm E, Lagerqvist B, Venge P, Wallentin L; J Am Coll Cardiol 2001; 38:979-86; Heeschen C, van Den Brand MJ, Hamm CW, Simoons-Sel AE; Circulation 1999; 100:1509-14; Benamer H, Steg PG, Benessiano J, et al.; Am Heart J 1999; 137:815-20). Bei *post mortem*-Studien an Patienten mit akuten Koronarsyndromen wurde

eine Erosion oder Ruptur der fibrösen Kappchen der atherosklerotischen Plaques, die der Pathophysiologie zugrunde liegen, identifiziert (Lindahl B, Diderholm E, Lagerqvist B, Venge P, Wallentin L; *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:979-86; Heeschen C, van Den Brand MJ, Hamm CW, Simoons ML; *Circulation* 1999; 100:1509-14). Eine Exposition von Bestandteilen der Plaques, Kollagen und anderen Komponenten der Gefäßwand führt zu einer Zunahme des Gefäßtonus und der Plättchen-Aktivierung (Farb A, Burke AP, Tang AL, et al.; *Circulation* 1996; 93:1354-63; Davies MJ, Thomas AC; *Br Heart J* 1985; 53:363-73; Davies MJ; *N. Engl J Med* 1997; 336:1312-4). Die Thromboembolie einer Koronararterie mit gesteigerter mikrovaskulärer Perfusion und Nekrose ist ein wesentlicher Bestandteil von akuten Koronarsyndromen (Heeschen C, van Den Brand MJ, Hamm CW, Simoons ML; *Circulation* 1999; 100:1509-14; Benamer H, Steg PG, Benessiano J, et al.; *Am Heart J* 1999; 137:815-20). Dementsprechend dienen empfindliche Marker für den Nachweis einer kleineren Verletzung des Myokards, insbesondere Troponine, als Surrogat-Marker einer arteriellen Thromboembolie, die auf einen aktiven thrombotischen Prozeß in der auslösenden Läsion zurückzuführen ist.

Im Gegensatz dazu könnte sCD40L in mehrfacher Weise direkt in die Pathophysiologie akuter Koronarsyndrome involviert sein. Jüngste Hinweise legen nahe, daß CD40L wesentlich zur Progression einer Atherosklerose und dementsprechend zu einer Destabilisierung von atherosklerotischen Plaques beiträgt (Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P; *Nature* 1998; 394:200-3; Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, et al.; *Nat Med* 1999; 5:1313-6). Es wurde vorgeschlagen, daß CD40/CD40L-Interaktionen Komplikationen durch Atherome fördern, indem sie die Expression von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren, Matrix-Metalloproteinasen und Prokoagulantien in verschiedenen Atherom-assoziierten Zelltypen induziert (Schonbeck U, Libby P.; *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:4-43; Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al.; *Nature* 1998; 391:591-4; Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA; *Blood* 2001; 98:1047-54; Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P.; *Circulation* 1997; 96:396-9; Miller DL; Yaron R, Yellin MJ; *J Leukoc Biol* 1998; 63:373-9; Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ, Peters MJ, Callard RE; *Immunology* 2000; 100:441-8). Neuere Studien haben gezeigt, daß neben Leukozyten und nicht-leukozytischen Zellen einschließlich Granulozyten, mononukleäre Phagozyten, Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur (Schonbeck U, Libby P; *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:4-43) aktivierte Plättchen große Mengen an sCD40L produzieren und freisetzen (Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA; *Blood* 2001; 98:1047-54). Eine andere Studie zeigt, daß ein Kardiopul-

monar-Bypass einen Anstieg der Konzentration von sCD40L im Plasma verursacht, der mit einer Abnahme des CD40L-Gehalts in Plättchen korrespondiert, was nahe legt, daß sCD40L primär aus den Plättchen stammt und zu den thrombotischen Komplikationen, die mit einem derartigen Bypass verbunden sind, beitragen könnte (Nannizzi-Alaimo L, Rubenstein MH, Alves VL, Leong GY, Phillips DR, Gold HK; Circulation 2002; 105:2849-2854). Auch wurde festgestellt, daß sCD40L positiv mit löslichem P-Selektin im Plasma und 11-Dehydro-Thromboxan B₂-Konzentrationen im Urin korreliert (Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, et al.; Circulation 2002; 106:399-402). Darüber hinaus zeigten experimentelle Untersuchungen, daß CD40L für eine Stabilisierung arterieller Thromben erforderlich ist (Andre P, Prasad KS, Denis CV et al.; Nat Med 2002; 8:247-52). Die vorliegende Studie liefert jetzt direkten Hinweis darauf, daß CD40L tatsächlich ein Marker der Plättchen-Aktivierung ist. Die Plättchen-Aktivierung, bestimmt durch Durchflußzytometrie bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen, korrelierte signifikant mit den Serumkonzentrationen an sCD40L (*Figur 7*). Interessanterweise erwies sich sCD40L als unabhängiger Vorhersagefaktor einer Plättchen-Aktivierung mit größter Aussagekraft. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie etablieren sCD40L-Konzentrationen als hoch informativen prognostischen Marker bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen, die gefährdet sind, eine Thrombose zu erleiden. Diese Befunde werden durch die Tatsache unterstützt, daß eine Hemmung des Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptors durch Abciximab das erhöhte Risiko bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen und erhöhten sCD40L-Konzentrationen aufhob. Während Troponin die Neigung eines Thrombus, eine Embolie hervorzurufen und zu Myokardnekrose zu führen, positiv anzeigt, spiegeln erhöhte Konzentrationen an sCD40L bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen die thrombotische Aktivität der auslösenden Läsion, Plättchen zu rekrutieren und aktivieren, wider.

In einer früheren Analyse einer Untergruppe von Patienten der CAPTURE-Studie wurde gezeigt, daß eine zusätzliche Behandlung mit dem Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten Abciximab das erhöhte Risiko Troponin-positiver Patienten auf das Maß von Troponin-negativen Patienten reduziert (Hamm CW, Heeschen C, Goldmann B, et al.; N Engl J Med 1999; 340:1623-9). Diese Patienten stellen ungefähr 1/3 der Patienten mit akuten Koronarsyndromen dar (Hamm CW, Braunwald E; Circulation 2000; 102:118-22; Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, et al; N Engl J Med 1996; 335:1342-9; Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, et al.; N Engl J Med 1996; 335:1333-41; Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, et al.; N Engl J Med 1992; 327:146-50; Hamm CW, Goldmann BU, Heeschen C, Kreyman G, Berger J, Meinertz T; N Engl J Med 1997; 337:1648-53). Ähnliche Befunden hin-

sichtlich Troponin T und Troponin I ergaben sich später aus anderen Studien (Newby LK, Ohman EM, Christenson RH, et al.; Circulation 2001; 103:2891-6; Januzzi JL, Chae CU, Sabatine MS, Jang IK; J Thromb Thrombolysis 2001; 11:211-5; Heeschen C, Hamm CW, Goldmann B, Deu A, Langenbrink L, White HD; Lancet 1999; 354:1757-62), und anschließend wurden Troponine in die neuen Richtlinien aufgenommen als Teil der Risikostratifizierung bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen (Hamm CW, Bertrand M, Braunwald E; Lancet 2001; 358:1533-8; Braunwald E, Maseri A, Armstrong PW, et al.; Eur Heart J 1998; 19:D22-30). In der vorliegenden Studie wird gezeigt, daß ein derartiger ausgeprägt positiver Effekt einer Anti-Plättchen-Therapie auch bei Patienten mit erhöhten sCD40L-Konzentrationen offenkundig ist. Die vorliegende Analyse legt nahe, daß Patienten mit akutem Koronarsyndromen, die erhöhte Konzentrationen an sCD40L aufweisen, wirksam durch den Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten Abciximab stabilisiert werden (*Figur 5a, b*). Bei einer berechneten Schwellenkonzentration von 5,0 µg/l wurde eine abrupte Änderung des Risikoquotienten von 0,87 für das zweite Quintil und 1,12 für das dritte Quintil hin zu signifikant niedrigeren Werten von 0,36 für das vierte Quintil und 0,38 für das fünfte Quintil beobachtet (*Figur 4*). Interessanterweise lieferten die Konzentrationen an TnT und sCD40L unabhängige Vorhersagewerte im Hinblick sowohl auf das Risiko ischämischer Ereignisse als auch auf die positive Wirkung einer Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Hemmung durch Abciximab. Patienten ohne Anzeichen einer Myokardverletzung (Troponin-Erhöhung fehlt), die jedoch gesteigerte Konzentrationen an sCD40L aufwiesen, zogen erheblichen Nutzen aus der Behandlung mit dem Glycoprotein IIb/IIIa-Inhibitor Abciximab. Folglich zogen Patienten mit hohem Risiko zu einer Thrombose der Koronargefäße, belegt entweder durch eine Erhöhung der sCD40L-Konzentration oder einer Erhöhung der TnT-Konzentration, die schließlich 54% der insgesamt in die CAPTURE-Studie involvierten Patienten ausmachten, einen deutlichen Vorteil aus der Behandlung mit Abciximab mit einem Risikoquotienten von 0,38 [0,21-0,72]; $p < 0,001$).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die vorliegende Studie die bedeutende und unabhängige Rolle von sCD40L als einen Marker der Plättchenaktivierung für die diagnostische und therapeutische Risikostratifizierung dokumentiert. Das erhöhte kardiale Risiko von Patienten mit hohen sCD40L-Konzentrationen, die eine Standardtherapie mit Heparin und Aspirin erhielten, wurde durch den Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Abciximab aufgehoben. Die kombinierte Verwendung von Troponinen und sCD40L, welche beide wesentliche Bestandteile der Pathophysiologie bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen darstellen, liefert

wichtige Einblicke in die Aktivität der Erkrankung, dem kardiologischen Risiko und der Wirksamkeit einer Behandlung mittels Glycoprotein IIb/IIIa-Hemmung durch Abciximab, welche der Verwendung eines einzelnen Markers überlegen ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem das Risiko, ein kardiovaskulär nachteiliges Ereignis, bedingt durch Koronarthrombos mit Hilfe eines individuellen Risikoprofils abgeschätzt werden kann. Dies soll durch die Messung der Konzentration eines Markers der Plättchenaktivierung erfolgen. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist weiterhin, ein Verfahren zur Evaluation der Wahrscheinlichkeit, daß eine Behandlung mit einem Wirkstoff zur Hemmung der Plättchenaktivierung von Vorteil ist, zu entwickeln. Mit Hilfe dieses Verfahren soll der behandelnden Arzt besser als bisher in die Lage versetzt werden, geeignete Maßnahmen auswählen zu können, um den Patienten positiv zu beeinflussen, ein nachteiliges Ereignis zu verhindern oder zumindest in seiner Schwere für den betroffenen Patienten zu vermindern.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird durch ein Verfahren zur Analyse von Proben in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen gelöst. Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt die Schritte aus: (a) Gewinnung einer zu untersuchenden Probe; (b) Inkubation der Probe mit einem oder mehreren Molekülen, die spezifisch an sCD40L binden; (c) Nachweisen und/oder quantifizieren von löslichem CD40-Ligand (sCD40L) in der Probe unter Verwendung immunologischer Methoden; und (d) Vergleich des für die zu untersuchende Probe erhaltenen Ergebnisses mit einem Referenzwert und/oder dem Ergebnis einer Referenzprobe.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die zu untersuchende Probe und/oder die Referenzprobe aus einem Säugetier, insbesondere aus dem Menschen, stammen. Weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die zu untersuchende Probe und/oder die Referenzprobe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus peripherem Blut oder Fraktionen davon und Zellkultur-Suspensionen oder Fraktionen davon. Bevorzugt ist weiterhin, daß die untersuchende Probe und/oder Referenzprobe Blutserum oder Blutplasma ist. Besonders bevorzugt ist peripheres Vollblut als zu untersuchende Probe und/oder Referenzprobe.

Gemäß einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die zu untersuchende Probe und/oder die Referenzprobe vorbehandelt sein, wobei dem peripheren Blut z.B. ein Gerinnungshemmer, insbesondere Heparin, zugesetzt wird.

Ein wesentlicher Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahren ist die Inkubation der Probe mit einem oder mehreren Molekülen, die spezifisch an sCD40L oder einen Teil davon, z.B. die KGD-Sequenz, binden. Diese Moleküle können aus einer sehr großen Vielzahl von für sCD40L spezifischen Molekülen ausgewählt sein. Bevorzugt ist, daß die an sCD40L bindenden Moleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern, die spezifisch gegen sCD40L oder gegen Teile davon gerichtet sind, oder Teilen oder Fragmenten davon und einem sCD40L-Rezeptor oder Teilen davon oder einem Integrin, z.B. dem Plättchen-Integrin α Iib β 3, oder Teilen davon. Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die Antikörper, Teile oder Fragmente davon polyklonale Antikörpern, monoklonale Antikörpern, Fab-Fragmente, scFv-Antikörper und Diabodies umfassen.

Gemäß eines weiteren Aspekts des Verfahrens der vorliegenden Erfindung können Komponenten des Verfahrens an eine feste Phase gebunden vorliegen, somit können die an einen Marker bindenden Moleküle in Lösung oder Matrix-immobilisiert vorliegen. Als Matrices können eine Vielzahl von dem Fachmann bekannten Materialien verwendet werden, wie zum Beispiel Harz-Matrices und/oder herkömmliche Säulenmatrices. Besonders bevorzugt ist weiterhin ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem die an einen Marker bindenden Moleküle an eines oder mehrere Detektionsmoleküle aus der Gruppe bestehend aus Fluorescein-thioisocyanat, Phycoerythrin, Enzymen (zum Beispiel Meerrettich-Peroxidase) und magnetisches Bead gekoppelt sind.

Gemäß einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens können die an sCD40L bindenden Moleküle mit einem Antikörper, an den eine oder mehrere Detektionsmoleküle gekoppelt sind, nachgewiesen werden. Es handelt sich somit um einen indirekten Nachweis der Bindung des Moleküls. Solche zweistufigen Nachweise sind dem Fachmann zum Beispiel aus der anti-Antikörper-Nachweisteknik bestens bekannt.

Gemäß einem weiteren Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung können zur Analyse der Probe immunzytologischen Verfahren angewandt werden. Dabei sind alle Verfahren geeignet, die eine spezifische Bestimmung anhand der sCD40L/Molekül-Interaktion erlauben. Bevorzugt sind Verfahren, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Sandwich-Enzym-Immuntest, ELISA und Festphasen-Immuntests.

Die für die zu untersuchende Probe ermittelten Ergebnisse werden üblicherweise mit einer Referenzprobe verglichen. Welche Probe als Referenzprobe dienen kann, wird insbesondere von der Art der untersuchten Probe und der Krankengeschichte des Individuums, aus dem die zu untersuchende Probe stammt, abhängen. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem die Referenzprobe aus einem oder dem Mittelwert mehrerer Säugetiere stammt, in dem/in denen eine kardiovaskuläre Erkrankung ausgeschlossen wurde. Dies muß aber nicht zwangsläufig so sein, wenn z.B. das Fortschreiten einer Erkrankung bestimmt werden soll, kann auch eine „alte“ Probe desselben Patienten als Referenzprobe verwendet werden. Dem Fachmann ist offensichtlich, welche Proben als Referenzprobe für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind.

Gemäß einem weiteren bevorzugten Verfahren beträgt der Referenzwert und/oder das Ergebnis einer Referenzprobe $\leq 5,0 \mu\text{g/l}$. Besonders bevorzugt beträgt der Referenzwert und/oder das Ergebnis einer Referenzprobe $\leq 4,7 \mu\text{g/l}$.

Gemäß einem weiteren Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung können die zu diagnostizierenden und/oder prognostizierenden und/oder deren Therapie zu überwachen- den kardiovaskulären Erkrankungen ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus stabiler und instabiler Angina, Myokardinfarkt, aktuellem Herzsyndrom, koronarer Arterienerkrankung und Herzinsuffizienz. Es soll jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich das erfindungsgemäße Verfahren noch für weitere kardiologische Erkrankungszustände eignet und anwenden läßt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen diagnostischen Kit, wobei der Kit Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, unter Umständen zusammen mit weiteren Komponenten und/oder Hilfsstoffen umfaßt. Solche Mittel sind bevorzugterweise mindestens ein Antikörper zum Nachweis von sCD40L und Mittel zur anschließenden Quantifizierung von sCD40L. Der Kit kann außerdem andere Komponenten und/oder Enzyme zur Durchführung der Verfahren der vorliegenden Erfindung, z.B. Gebrauchsanweisungen zur Interpretation der Ergebnisse des Tests im Hinblick auf das Risikoprofil des Patienten und entsprechende Gegenmaßnahmen und Therapievorschlüge enthalten.

Bevorzugt ist, das erfindungsgemäße Verfahren mit Hilfe eines einen diagnostischer Kits durchzuführen, der goldmarkierte polyklonale Maus-Indikatorantikörper, biotinylierte poly-

klonale Nachweisantikörper und eine Testvorrichtung, umfassend ein Fiberglas-Vlies, umfaßt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen und/oder zur Überwachung von deren Therapie. Dies geschieht durch die quantitative und kritische Bestimmung von sCD40L. Aufgrund des daraufhin erstellbaren Risiko profils können dann geeignete Gegenmaßnahmen durch den behandelnden Arzt durchgeführt werden, um den Patienten positiv zu beeinflussen und das nachteilige Ereignis zu verhindern oder zumindest in seiner Schwere für den betroffenen Patienten zu vermindern. Eine solche Therapie kann erfindungsgemäß die Verabreichung von Inhibitoren des Glycoprotein IIb/III-Rezeptors insbesondere Absiximab umfassen. Dem Fachmann sind jedoch weitere mögliche Therapien bekannt, um kardiovaskuläre Erkrankungen zu therapieren, die nach herkömmlichen Schemata erfolgen können.

Die Erfindung soll nun im folgenden anhand von Beispielen unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren näher erläutert werden, ohne jedoch dadurch begrenzt zu werden. In den Figuren zeigt:

Figur 1 den Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration an sCD40L und der Häufigkeit eines kardialen Ereignisses nach 24 Stunden, 72 Stunden, 30 Tagen und 6 Monaten in der Patientengruppe, die ein Placebo erhalten hatte ($n = 544$). Die Patienten wurden in 5 Quintile eingeteilt. Der Bereich der sCD40L-Konzentrationen war wie folgt: 0,003-1,9 $\mu\text{g/l}$ (Quartil 1), 1,9-3,5 $\mu\text{g/l}$ (Quartil 2), 3,5-5,0 $\mu\text{g/l}$ (Quartil 3), 5,0-6,3 $\mu\text{g/l}$ (Quartil 4) und $> 6,3 \mu\text{g/l}$ (Quartil 5). $p < 0,001$ nach 72 Stunden, 30 Tagen und 6 Monaten.

Figur 2 eine Darstellung nach Kaplan-Meier der kumulativen Inzidenz von Myokardinfarkt mit tödlichem oder nicht-tödlichem Ausgang nach 72 Stunden (a) und 6 Monaten (b) gemäß den *Base Line*-Werten der sCD40L-Konzentration (diagnostischer Schwellenwert 5,0 $\mu\text{g/l}$) in der Placebo-Gruppe ($n = 544$).

Figur 3 den angepaßten Risikoquotienten (einschließlich 95% Vertrauensintervall) bei der Behandlung mit Abciximab gemäß den sCD40L-Quintilen. Eine erfolgreiche Behandlung wird definiert als Reduktion von tödlichen oder nicht-tödlichen Myokardinfarkten im Verlauf

von 6 Monaten. Ein Risikoquotient $< 1,0$ gibt die erfolgreiche Behandlung mit Abciximab im Vergleich zur Placebo-Behandlung an.

Figur 4 eine Kalpan-Meier-Darstellung von Mortalität und nicht-tödlichem Myokardinfarkt 72 Stunden (a) und 6 Monate (b) gemäß der sCD40L-Konzentration bei Patienten, die entweder ein Placebo oder Abciximab erhalten hatten.

Figur 5 die Plättchenaktivierung in Abhängigkeit von der Aktivität der Erkrankung. Die Plättchenaktivität, bestimmt durch Monozyt-Plättchen-Aggregate, war bei Patienten mit stabiler coronarer Herzerkrankung signifikant erhöht. Eine weitere signifikante Zunahme der Plättchenaktivierung wurde in Patienten mit akuten Koronarsyndromen beobachtet.

Figur 6, daß die sCD40L-Serumkonzentrationen eng mit dem Ausmaß der Plättchenaktivierung bei Patienten mit und ohne akute Koronarsyndrome korrelieren. Die unterbrochen dargestellten Linien teilen die Patienten in Tertile gemäß der Plättchenaktivierung ($< 15\%$, $15\%-30\%$, $> 30\%$) bzw. sCD40L-Serumkonzentrationen ($< 2,5 \text{ g/l}$; $2,5-4,5 \text{ µg/l}$; $> 4,5 \text{ µg/l}$) ein.

Beispiele

Material und Methoden

1. Patienten

Die CAPTURE-Studie registriert 1.265 Patienten mit refraktärer instabiler Angina (61% männlich, im Alter von 61 [48-72, 95% Vertrauensintervall]) zwischen Mai 1993 und Dezember 1995. Alle CAPTURE-Patienten klagten über wiederkehrende Brustschmerzen im Ruhezustand, assoziiert mit EKG-Änderungen während einer Behandlung mit intravenösem Heparin und Glycerintrinitrat im Mittel für 14 Stunden. Die gesamte Patientenpopulation wurde einer Koronarangiographie unterzogen, bevor das Auftreten einer deutlichen koronaren Arterienerkrankung mit auslösenden Läsionen $\geq 17\%$, die für eine Angioplastie geeignet waren, dokumentiert wurden. Die Patienten wurden einer Behandlung durch Abciximab oder Placebo zufallsverteilt zugeordnet. Die Behandlung wurde innerhalb von 2 Stunden nach der Zuordnung begonnen. Bei allen Patienten waren innerhalb von 18 bis 24 Stunden nach Beginn der Behandlung koronare Interventionen vorgesehen (CAPTURE. Lancet 1997;

349:1429-35). Es wurden im Mittel 8,7 (3,6-11,3) Stunden nach Einsetzen der Symptome Blutproben (n = 1096) gewonnen (*Base Line*).

Primäre Endpunkte der Studie waren Mortalität, Myokardinfarkt oder die Notwendigkeit zu sofortiger Intervention (Angioplastie, *Bypass*-Operationen der Koronararterie) aufgrund einer Instabilität während 30 Tagen oder 6 Monaten. Bei Patienten, die während des Krankenhausaufenthalts einen Herzinfarkt erlitten hatten, wurde ein solcher diagnostiziert, wenn ihre Werte der Kreatinkinase-Enzymaktivität in mindestens zwei Proben mehr als dreimal so hoch waren wie die obere Grenze des Normalbereichs oder wenn ihr EKG neue deutliche Q-Zacken in mehr als zwei aufeinanderfolgenden Intervallen aufwies. Diese strikte Definition wurde gewählt, um jeden unbedeutend geringen Anstieg der Kreatinkinase nach PTCA auszuschließen. Bei Patienten mit einem Myokardinfarkt nach der Entlassung wurde ein solcher definiert, wenn ihre Werte der Kreatinkinase-Enzymaktivität mehr als doppelt so hoch waren, wie die obere Grenze des Normalbereichs oder wenn ihr EKG neue deutliche Q-Zacken in zwei oder mehr aufeinanderfolgenden Intervallen aufwies. Der sekundäre Endpunkt war die symptomatische koronare Restenose der behandelten Läsion mit einem Stenosedurchmesser $\geq 70\%$ und die Notwendigkeit zu wiederholter Revaskularisierung während der nachfolgenden 6 Monate.

2. Validierung von Patienten mit akutem Brustschmerz

Eine separate Gruppe von 626 Patienten mit Brustschmerz (161 Frauen und 465 Männer, mittleres Alter 61 [38-82] Jahre), die in fortlaufender Reihe mit akutem Brustschmerz, der weniger als 12 Stunden (im Mittel 5,1 [2,1-10,4] Stunden) andauerte, in die Notaufnahme kamen. Nicht berücksichtigt wurden Patienten mit einer charakteristischen ST-Hebung im Basis-EKG bzw. einem dokumentierten akuten Myokardinfarkten während der vorangegangenen 2 Wochen. Blutproben wurden zum Zeitpunkt der Aufnahme (vor Beginn der Behandlung) und 4 Stunden später gewonnen, auf Eis gehalten, innerhalb von 20 Minuten nach Probennahme zentrifugiert und zur späteren Analyse bei -80°C gelagert. Es hatte sich gezeigt, daß diese Behandlung zu reproduzierbaren Ergebnissen bei der Messung der sCD40L-Konzentrationen führte (Nannizzi-Alaimo L, Rubenstein MH, Alves VL, Leong GY, Phillips DR, Gold HK. *Circulation* 2002; 105:2849-54). Die Patienten wurden bis zu ihrer Entlassung aus dem Krankenhaus und 30 Tage danach beobachtet, um tödliche und nicht-tödliche Myokardinfarkte zu verzeichnen. Das Vorhandensein einer koronaren Arterienerkrankung wurde durch eines der folgenden Kriterien nachgewiesen: EKG-Anzeichen auf eine Myokard-

Ischämie (neue Änderungen in der ST-Strecke oder Inversion der T-Zacke), eine koronare Herzerkrankung in der Anamnese (Myocardinfarkt oder koronare Revaskularisierung, ein positiver Belastungstest oder Einengung des Durchmessers einer Hauptkoronararterie um mindestens 50% in einem früheren Angiogramm). Patienten ohne koronare Herzerkrankung hatten ein normales Koronar-Angiogramm aufzuweisen. An einer Untergruppe von Patienten, die 131 Patienten mit akuten Koronarsyndromen, 20 Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung und 10 Patienten mit ausgeschlossener koronarer Herzerkrankung einschloß, wurde die Plättchenaktivierung mittels Durchflußzytometrie bestimmt.

3. Biochemische Analyse

Plasmaproben, antikoaguliert mit Natriumheparin, wurden zentral bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der kardialen Marker wurde in Unkenntnis der Krankengeschichte der Patienten und der angeordneten Behandlung im Forschungslabor der Universität Frankfurt durchgeführt. Die Plasmaspiegel von sCD40L (Nachweisgrenze 0,005 µg/l), lösliches P-Selektin (0,5 µg/l), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α, hochempfindlich; 0,12 ng/l) und lösliches intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1; 0,35 µg/l) wurden mittels ELISA (R&D Systems, Wiesbaden) gemessen. Zur Quantifizierung von Troponin T (TnT) wurde ein Ein-Schritt-Enzym-Immuntest auf der Grundlage der Elektrochemilumineszenz-Technologie (Elecsys 2010, Roche Diagnostics; Nachweisgrenze 0,01 µg/l) verwendet. C-reaktives Protein (CRP) wurde mit Hilfe des Behring BN II Nephelometers (Behring Diagnostics; Nachweisgrenze 0,2 µg/l) gemessen.

5. Quantitative Bestimmung von sCD40L

Die sCD40L-Konzentration wurde unter Verwendung der Sandwich-Enzym-Immuntest-Technik (R&D Systems, Wiesbaden) bestimmt. Eine Mikrotiterplatte wurde mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch gegen sCD40L gerichtet war, beschichtet. Standards und Proben wurden in die *Wells* pipettiert und vorhandenes sCD40L wurde durch den immobilisierten Antikörper gebunden. Nachdem nicht-gebundenes Material gewaschen worden war, wurde ein Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper, der spezifisch gegen sCD40L gerichtet war, zu den *Wells* gegeben. Nach einem Waschschriff, um nicht gebundenes Antikörper-Enzym-Reagenz wegzuwaschen, wurde eine Substrat-Lösung zu den *Wells* gegeben, und die Farbe entwickelte sich im Verhältnis zur Menge an sCD40L, die im ersten Schritt gebunden wurde. Die Farbentwicklung wurde abgestoppt und die Farbintensität wurde gemessen.

6. Schnelltest für den Nachweis von CD40L

Ein Schnelltest auf der Basis der Chromatographie-Festphase-Technologie mit einem Cocktail aus goldmarkierten polyklonalen Indikator-Antikörpern aus der Maus und biotinylierten polyklonalen *Capture*-Antikörpern wurde entwickelt. Das Testsystem enthielt mindestens 0,3 µg jedes Antikörpers. 200 µl heparinisiertes Vollblut oder zentrifugiertes Plasma wurde der Testvorrichtung zugesetzt. Nach Trennung der zellulären Blutkomponenten von der Plasmafraktion über ein Fiberglas-Vlies wurde das Plasma, das durch das Vlies hindurchwanderte, in einem Puffer aufgenommen und zu dem adsorbierten Antikörper gegeben. Die Antikörper und die sCD40L-Moleküle der Proben bildeten Sandwich-Komplexe, die zu der Signallinie wanderten und in dem Lesefenster mittels Interaktion mit Biotin-Streptavidin akkumulierten. Positive Ergebnisse ($sCD40L \geq 4,7 \mu g/l$) wurden durch eine farbige Linie angezeigt, die sich innerhalb von 15 Minuten entwickelte. Die Indikator-Antikörper, die nicht gebunden wurden, wanderten weiter und wurden an einer Kontrolllinie, bestehend aus Festphase-Anti-Maus-IgG-Antikörpern ($\geq 0,2 \mu g$) gebunden. Das Auftreten dieser Kontrolllinie abwärts von der Signallinie bestätigte die fehlerfreie Testfunktion einschließlich des ungehinderten Durchflusses des Plasma.

7. In vivo-Plättchenaktivierung

Blutproben, antikoaguliert mit Natriumcitrat, wurden sofort 10 Minuten mit 1,1% Paraformaldehyd in PBS, 4,6-fach verdünnt in destilliertem Wasser zur Lyse der Erythrozyten, behandelt und die fixierten Zellen in PBS gewaschen. Um P-Selektin bei Plättchen zu bestimmen, wurde das resuspendierte Pellet 60 Minuten mit Phycoerythrin (PE)-konjugiertem Glycoprotein IIb-spezifischem monoklonalem Antikörper (CD41; Dako Carpenteria, Kalifornien) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem P-Selektin-spezifischem monoklonalem Antikörper (BD Pharmingen, San Diego, Kalifornien) inkubiert. Die Plättchen wurden durch ihre charakteristische Vorwärts- und Seitwärts-Lichtstreuung und die Bindung des PE-konjugierten Glycoprotein IIb-spezifischen Antikörpers charakterisiert. Die Plättchenaktivierung wird in % der P-Selektin-positiven Plättchen ausgedrückt. Um zirkulierende Monozyt-Plättchen-Aggregate zu identifizieren, wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem Glycoprotein IIIa-spezifischem monoklonalem Antikörper (CD61; Dako) und PE-konjugiertem monoklonalem Antikörper gegen CD14 (BD Pharmingen) gefärbt. Die Monozyten wurden durch ihre charakteristischen Vorwärts- und Seitwärts-Lichtstreuungseigenschaften und die Bindung von PE-konjugiertem CD14-spezifischem Antikörper identifiziert. Monozyt-Plättchen-

Aggregate wurden definiert als Monozyten, bei denen sich Glycoprotein IIIa nachweisen ließ, und werden in Prozent der Monozyten -Gesamtzahl angegeben (Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI, Circulation 2001; 104:1533-7). Jede Färbung wurde in Gegenwart gesättigter Konzentrationen eines monoklonalen unkonjugierten Ratte-Antikörpers gegen Fc-Rezeptoren (anti-CD16/32, BD Pharmingen) inkubiert um die unspezifische Bindung zu reduzieren und Isotyp-identische Antikörper dienten als Kontrolle (IgG₁-PE und IgG_{2a}-FITC; BD Pharmingen). Insgesamt wurden 50.000 Signale mit Hilfe von FACS-Calibur (Becton/Dickinson, Heidelberg) und der CellQuest-Software (BD Pharmingen) analysiert.

8. Statistische Verfahren

Nach einer blinden Beurteilung der biochemischen Marker und der Plättchenaktivierung wurden die Testergebnisse mit der Datenbank abgeglichen. Um Patienten mit verschiedenen Graden eines kardiologischen Risikos unterscheiden zu können, wurde eine orientierende Datenanalyse gewählt. CAPTURE-Patienten wurden nach der sCD40L-Konzentration der Quintile eingeteilt. Für jeden der vier Zeitpunkte (24 Stunden, 72 Stunden, 30 Tage und 6 Monate) wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt, und Patienten in dem ersten Quintil (sCD40L < 2,0 µg/l) dienten als Referenz. *Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve Analysis* über den dynamischen Bereich des sCD40L-Tests wurde verwendet, um die Schwellenkonzentration für sCD40L zu identifizieren, die den höchsten Vorhersagewert für die Risikostratifikation von Patienten mit akuten Koronarsyndromen lieferte. Die Auswirkung einer Erhöhung der biochemischen Marker auf das Schicksal des Patienten wurde unter Verwendung eines *Cox Proportional-Hazards Regression Model*, welches die *Base Line*-Werte der prognostischen Faktoren (z.B. EKG-Befunde, kardiale Risikofaktoren, Alter und Geschlecht) und die zufällig ausgewählte Behandlung evaluiert (Harrell FE, Jr., Lee KL, Pollock BG. J Natl Cancer Inst 1988; 80:1198-202). Alle Ergebnisse für kontinuierliche Variablen werden als Mediane mit 95% Vertrauensintervall ausgedrückt. Gleiche Zwischengruppen wurden durch den T-Test (zweiseitig) oder ANOVA bei Experimenten mit mehr als zwei Untergruppen analysiert. *Post hoc*-Bereichstests und paarweise multiple Vergleiche wurden mit dem T-Test (zweiseitig) mit Bonferroni-Abgleich durchgeführt. Der Vergleich von kategorischen Variablen wurde mit dem Pearson- χ^2 -Test durchgeführt. Alle Analysen wurden mit SPSS 11,0 (SPSS, Inc.) durchgeführt. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant beurteilt.

Beispiel 1: Zusammenhang zwischen kardialem Risiko und sCD40L-Konzentration

Die Ausgangscharakteristika der für diese Studie ausgewählten Population ($n = 1088$, 86% der CAPTURE-Patienten) unterschied sich nicht von der Gesamtpopulation der Studie im Hinblick auf Alter, Geschlecht, kardiovaskuläres Risikoprofil und begleitende Behandlung vor und nach der zufälligen Auswahl. Die Reduktion kardialer Ereignisse in der Abciximab-Gruppe der Population war mit der gesamten CAPTURE-Population vergleichbar (vor PTCA: 2,2% Placebo vs. 0,9% Abciximab, $p = 0,094$; nach PTCA: 7,9% vs. 3,5%, $p = 0,002$; nach 30 Tagen: 9,0% vs. 4,2%, $p = 0,002$) (CAPTURE. Lancet 1997; 349:1429-35).

sCD40L war in den *Base Line*-Serumproben aller 1088 Patienten mit einem Mittelwert von $4,5 \mu\text{g/l}$ (Bereich 0,003-20,4) nachweisbar. Die sCD40L-Konzentration korrelierte nicht mit den gemessenen Konzentrationen an TnT ($r = 0,14$) und CRP ($r = 0,11$). Die Patienten der Placebo-Gruppe ($n = 544$) wurden nach ihren gemessenen sCD40L-Konzentrationen in Quintile eingeteilt: (sCD40L 1) $< 1,93 \mu\text{g/l}$ ($n = 100$), (sCD40L 2) $1,93\text{-}3,50 \mu\text{g/l}$ ($n = 102$), (sCD40L 3) $3,50\text{-}5,00 \mu\text{g/l}$ ($n = 121$), (sCD40L 4) $5,00\text{-}6,30 \mu\text{g/l}$ ($n = 115$) bzw. (sCD40L 5) $> 6,30 \mu\text{g/l}$ ($n = 106$). Während der ersten 24 Stunden waren die kombinierten Endpunkte Mortalität und nicht-tödlicher Myokardinfarkt nur in dem fünften sCD40L-Quintil im Vergleich zu dem ersten Quintil leicht erhöht ($p = 0,13$) (Figur 1). Zu späteren Zeitpunkten (72 Stunden, 30 Tage, 6 Monate) traten diese Ereignisse signifikant häufiger sowohl in dem vierten als auch dem fünften Quintil ($p = 0,003$, $p = 0,0004$ bzw. $p = 0,001$) auf.

Auf der Grundlage der oben beschriebenen Befunde wurden die Patientenproben nach der berechneten Schwellenkonzentration aufgeteilt. 221 Patienten (40,6%) wiesen sCD40L-Konzentrationen von $5,0 \mu\text{g/l}$ oder darüber auf, und 323 Patienten wiesen Werte $< 5,0 \mu\text{g/l}$ auf. Wie Tabelle 1 zeigt, traten keine signifikanten Unterschiede in den Ausgangscharakteristika der beiden Gruppen auf. Bei Patienten mit niedrigen sCD40L-Konzentrationen waren die kombinierten Endpunkte tödlicher und nicht-tödlicher Myokardinfarkt signifikant von denen von Patienten mit erhöhten sCD40L-Konzentrationen sowohl 24 Stunden vor dem Verfahren (4,1% vs. 0,9%; $p = 0,016$) als auch 72 Stunden danach (einschließlich koronarer Interventionen bei allen Patienten) (13,1% vs. 4,3%; vs. 4,3%; $p < 0,001$) verschieden (Figur 2a). Während der sechsmonatigen Folgezeit divergierten die Kurven, welche die Häufigkeit eines Ereignisses anzeigen, bei Patienten mit hohen bzw. niedrigen sCD40L-Konzentrationen weiter (Figur 2b). Signifikante Unterschiede gab es sowohl nach 30 Tagen (14,5% vs. 5,3%; $p < 0,001$) als auch nach 6 Monaten (18,6% vs. 7,1%; $p < 0,001$). Aufgrund der relativ niedri-

gen Mortalität der CAPTURE-Gruppe unterschied sich die Endpunktmortalität nach 6 Monaten nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen (2,3% vs. 1,5%; $p = 0,72$). Der Vorhersagewert von sCD40L war von einer Myokardnekrose unabhängig. Bei TnT-negativen Patienten wurde mittels der sCD40L-Konzentration eine Gruppe von Patienten mit erhöhtem kardialen Risiko (13,6%) identifiziert, das sich nicht signifikant vom kardialen Risiko TnT-positiver Patienten (14,0%; $p = 1,00$) unterschied. *Receiver Operating Characteristics Curve Analysis* bestätigte eine Schwellenkonzentration von 5,0 $\mu\text{g/l}$ für den maximierten Vorhersagewert von sCD40L. Wiederholte, nicht dringende kardiologische Interventionen während der ersten 6 Monate waren bei Patienten mit hohen sCD40-Konzentrationen nicht signifikant verschieden von denen bei Patienten mit niedrigen sCD40L-Konzentrationen (6,2% vs. 4,5%; $p = 0,45$).

Von 626 Patienten ohne ST-Hebung, die mit akutem Brustschmerz in der Notaufnahme vorgestellt wurden, litten 308 Patienten an akutem Koronarsyndrom (117 Patienten hatten einen akuten Myokardinfarkt, gestützt auf einer Troponin-Erhöhung $\geq 0,1 \mu\text{g/l}$, erlitten). Bei den anderen Patienten wurden folgende Diagnosen gestellt: $n = 91$ stabile Angina, $n = 10$ Lungenembolie, $n = 11$ kongestive Herzinsuffizienz, $n = 7$ Myokarditis und $n = 199$ kein Hinweis auf eine Herzerkrankung. sCD40L-Konzentrationen waren bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen signifikant höher (4,53 [3,19-5,87] $\mu\text{g/l}$) im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina (2,41 [1,99-3,52] $\mu\text{g/l}$; $p < 0,001$) bzw. Patienten ohne Anzeichen einer Herzerkrankung (1,57 [0,88-1,76] $\mu\text{g/l}$; $p < 0,001$). Der Durchschnittswert der oberen Referenzgrenze (*Upper Reference Limit*, URL) von 97,5 bei Patienten ohne Anzeichen kardialer Beschwerden betrug 4,7 $\mu\text{g/l}$ und der URL-Durchschnittswert von 99 lag bei 6,2 $\mu\text{g/ml}$. Ähnlich wie bei den Ergebnissen, die in der CAPTURE-Studie erhalten wurden waren, korrelierten die sCD40L-Serumkonzentrationen nicht mit Nekrosemarkern (Troponin T), Entzündungsmarkern (CRP, $\text{TNF-}\alpha$) und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1). Bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen wiesen 43,5% sCD40L-Serumkonzentrationen oberhalb des 97,5 URL-Durchschnittswerts und 21,8% sCD40L-Serumkonzentrationen oberhalb des 99 URL-Durchschnittswerts auf. Unter Verwendung einer festgesetzten Schwellenkonzentration für sCD40L von 5,0 $\mu\text{g/l}$ wurden Patienten mit erhöhten sCD40L-Serumkonzentrationen als Hochrisiko-Population identifiziert (festgesetzter Risikoquotient 3,00 [1,35-6,71]; $p = 0,009$). Innerhalb der gesamten heterogenen Population von Patienten mit Brustschmerz, war die festgesetzte Schwellenkonzentration von 5,0 $\mu\text{g/l}$ ebenfalls zuverlässig, um Patienten zu identifizieren, die ein hochgradiges Risiko für kardiologische Ereignisse während der nach fol-

genden 30 Tage aufwiesen (festgesetzter Risikoquotient 6,65 [3,18 bis 13,89]; $p < 0,001$). Die Fläche unter der ROC-Kurve betrug 0,75 [0,67-0,83] und ein maximierter Vorhersagewert wurde bei einer Schwellenkonzentration von 4,8 $\mu\text{g/l}$ erreicht.

Beispiel 2: Angiographische Befunde und sCD40L-Konzentration

Die *Base Line*-Koronarangiogramme bei Patienten mit erhöhten sCD40L-Konzentrationen zeigten komplexere Charakteristika der Läsionen. Bei 40,6% der Patienten mit hohen sCD40L-Konzentrationen wurden Läsionen vom Typ B2+ oder C dokumentiert, während nur 27,5% der Patienten mit niedrigen sCD40L-Konzentrationen komplexere Läsionscharakteristika aufwiesen ($p = 0,004$).

Der *Base Line*-Wert für den TIMI-Durchfluß war bei 59,6% der Patienten mit hohen sCD40L-Konzentrationen und bei 58,9% der Patienten mit niedrigen sCD40L-Konzentrationen normal ($p = 0,049$). Ein TIMI-Durchfluß ≤ 1 wurde für 7,8% der Patienten mit hohen sCD40L-Konzentrationen im Vergleich zu 5,7% Patienten mit niedrigen sCD40L-Konzentrationen dokumentiert ($p = 0,67$).

Ein Thrombus war zum Zeitpunkt der Aufnahme bei 11,1% der Patienten mit hohen sCD40L-Konzentrationen im Vergleich zu 4,8% Patienten mit niedrigen sCD40L-Konzentrationen sichtbar ($p = 0,009$). Alle Patienten mit sichtbarer Thrombusbildung wiesen sCD40L-Konzentrationen $> 2,5 \mu\text{g/l}$ auf.

Beispiel 3: Wirkung von Abciximab auf die sCD40L-Konzentration

Eine logistische Regressionsanalyse wies auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit einer Behandlung mit Abciximab und der sCD40L-Konzentrationen hin ($p < 0,001$). Die Patienten wurden wie oben angegeben in Quintile eingeteilt. Für die ersten zwei Quintile wurden keine Unterschiede hinsichtlich eines kardialen Risikos bei einer Behandlung mit Placebo oder Abciximab beobachtet (*Figur 3*). Eine signifikante und gleichermaßen ausgeprägte Reduktion kardialer Ereignisse wurde für die oberen beiden Quintile dokumentiert. Der Befund einer Änderung der Ungleichheit auf 0,35 zwischen den zweiten und dritten Quintilen legt eine günstige Schwellenkonzentration in diesem Bereich der sCD40L-Konzentrationen nahe. Demgemäß wurden die Kurven, welche die Häufigkeit eines kardialen Ereignisses in Gestalt eines tödlichen oder nicht-tödlichen Myokardinfarkts darstellen, unter Verwendung einer Schwellenkonzentration von 5,0 $\mu\text{g/l}$ erzeugt. Ereignisse vor diesem Ver-

fahren waren bei Patienten mit niedrigen sCD40L-Konzentrationen, die Placebo erhielten, selten (0,9%), während bei 3,4% der Patienten Ereignisse im Zusammenhang mit einer coronaren Intervention auftraten (*Figur 4a*). Bei Patienten mit niedrigen sCD40L-Konzentrationen wurde kein Unterschied zwischen Patienten, die Abciximab und denen, die Placebo erhielten, beobachtet (24 Stunden: 1,2% vs. 0,9%; 72 Stunden: 3,8% vs. 4,3%). Nur wenige zusätzliche Ereignisse wurden in den anschließenden 6 Monaten registriert. Die Gesamthäufigkeit betrug 7,1% führte (*Figur 4b*).

Im Gegensatz dazu war die Häufigkeit von Anfällen signifikant höher bei Patienten mit hohen sCD40L-Konzentrationen, die Placebo erhalten hatten, sowohl vor PTCA (4,1%) als auch unter PTCA (9,0%), ebenso wie in der nachfolgenden Zeit nach der Entlassung, was zu einer Gesamthäufigkeit von 18,6% nach sechs Monaten führte. Ereignisse, die vor und unter PTCA auftraten, wurden durch Behandlung mit Abciximab wirksam auf 0,5% vor PTCA (Risikoquotient 0,12 [0,01-0,92]; $p = 0,013$) und 2,9% für PTCA-bezogene Ereignisse (Risikoquotient 0,19 [0,08-0,49]; $p < 0,001$) reduziert. Diese Verbesserung blieb über sechs Monate nach dem Ereignis bestehen, was zu einer kumulativen Häufigkeit der Ereignisse von 7,8% vs. 18,6% in der Placebo-Gruppe führte (Risikoquotient 0,37 [0,20-0,68]; $p = 0,001$). Dieser Wert ist vergleichbar mit dem, der bei Patienten mit niedrigen sCD40L-Konzentrationen (7,1%) beobachtet wurde. Weiterhin war die Wirkung der Glycoprotein IIb/IIIa-Hemmung ohne das Auftreten einer Myokardnekrose offensichtlich. Bei TnT-negativen Patienten wurde mittels der sCD40L-Konzentration eine Untergruppe von Patienten identifiziert, die eine signifikante Reduktion kardialer Ereignisse zeigten, wenn sie Abciximab (2,8% vs. 10,2%; Placebo vs. Abciximab; $p = 0,022$) erhielten.

Die Auflösung eines Thrombus während der angeordneten Behandlung vor Koronarintervention war bei Patienten mit hohen sCD40L-Konzentrationen besonders auffällig, wenn sie mit Abciximab behandelt wurden, mit einer relativen Reduktion von 63% (Placebo: -21%; $p < 0,01$). Eine Thrombusbildung bei Patienten mit niedrigen sCD40L-Konzentrationen war selten und eine signifikante Auflösung wurde weder in der Placebogruppe ($p = 0,75$) noch in der Abciximab-Gruppe ($p = 0,82$) erreicht.

Beispiel 4: sCD40L als Marker einer Plättchen-Aktivierung *in vivo*

Um die Hypothese zu verifizieren, daß sCD40L tatsächlich einen Marker für die Plättchen-Aktivierung darstellt, wurde das Verhältnis der Plättchen-Aktivierung und der sCD40L-

Serumkonzentrationen in einer Untergruppe von Patienten mit akutem Brustschmerz ($n = 151$) prospektiv untersucht. Das Ausmaß der Plättchen-Aktivierung war bei Patienten mit akuten Coronarsyndromen im Vergleich sowohl zu Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung als auch zu Patienten ohne koronare Herzerkrankung signifikant erhöht (*Figur 5*). Es wurde eine strenge Korrelation zwischen der Plättchen-Aktivierung, bestimmt mittels Monozyt-Plättchen-Aggregate (%), und der sCD40L-Konzentration beobachtet ($r = 0,75$; $p < 0,0001$) (*Figur 6*). Ähnliche Ergebnisse wurden für P-Selektin ($p < 0,001$) erhalten. Die Patienten wurden nach ihren gemessenen sCD40L-Konzentrationen in Tertile eingeteilt: (sCD40L 1) $< 2,5 \mu\text{g/l}$ ($n = 55$), (sCD40L 2) $2,5-4,5 \mu\text{g/l}$ ($n = 50$), bzw. (sCD40L 3) $> 4,5 \mu\text{g/l}$ ($n = 56$). Bei Patienten des ersten sCD40L-Tertils betrug der prozentuale Anteil von Monozyt-Plättchen-Aggregaten $11,3\%$ [$9,6-12,9$]. In dem zweiten und dritten sCD40L-Tertil war die Plättchen-Aktivierung signifikant höher ($22,3$ [$19,8-24,8$] % bzw. $34,1$ [$30,0-38,3$] %; $p < 0,001$). Besonders interessant ist, daß bei allen Patienten (mit Ausnahme eines Patienten) die sCD40L-Serumkonzentrationen $> 4,5 \mu\text{g/l}$ aufwiesen, mindestens 15% der Monozyten mit Plättchen aggregiert waren, was auf eine deutliche Plättchen-Aktivierung bei diesen Patienten hinweist. Im Gegensatz dazu zeigten die Serumkonzentrationen an löslichem P-Selektin einen deutlich weniger ausgeprägten Zusammenhang mit der Plättchen-Aktivierung ($r = 0,41$ für Plättchen-Monozyt-Aggregate bzw. $r = 0,36$ die P-Selektin). In einer Multivarianz-Regressionsanalyse zeigte sich, daß eine Diabetes-Erkrankung ($p = 0,015$), eine Hypercholesterinämie ($p = 0,006$) und die sCD40L-Konzentration ($p < 0,0001$), nicht jedoch die Konzentration an löslichem P-Selektin signifikant mit der Plättchen-Aktivierung assoziiert war (Monozyt-Plättchen-Aggregate $> 30\%$).

Tabelle 1: *Base Line*-Charakteristika von sCD40L in der Placebo-Gruppe

	sCD40L niedrig	sCD40L hoch
n	323	221
männlich	73,3%	70,2%
Alter	60,5 ± 9,9	62,3 ± 10,5
Anamnese		
Angina mehr als 4 Wochen	57,5%	54,6%
Infarkt 14-30 Tage	3,5%	2,4%
Infarkt mehr als 30 Tage	19,5%	21,0%
PTCA	19,1%	15,9%
CABG	3,5%	3,4%
Risikofaktoren		
Diabetes	12,1%	9,6%
Hypercholesterinämie	32,5%	33,6%
Bluthochdruck	39,3%	34,5%
Rauchre	40,9%	42,1%
Medikation vor Registrierung		
Aspirin	98,1%	97,7%
Heparin i.v.	99,2%	98,6%
Nitrate i.v.	98,8%	99,7%
Beta-Blocker	65,0%	61,4%
Ca ²⁺ -Antagonisten	56,0%	55,2%

Tabelle 2: Tödlicher und nicht-tödlicher Myocardinfarkt innerhalb der ersten 6 Monate
(Multivarianz-Regressionsanalyse)

Variable	OR	95% CI	p-Wert
Geschlecht	0,91	0,68-1,39	0,16
Alter mehr als 65 Jahre	1,36	0,91-1,82	0,34
Diabetes mellitus	1,22	0,83-1,49	0,61
Hypercholesterinämie	0,90	0,68-1,13	0,59
Bluthochdruck	1,00	0,89-1,04	1,00
Geschichte einer CHD	0,86	0,65-1,19	0,72
ST-Senkung	1,04	0,76-1,54	0,74
TnT > 0,1 µg/l	2,94	1,75-7,26	< 0,001
CRP > 10 mg/l	2,03	1,11-3,59	0,018
sCD40L > 5,0 µg/l	2,71	1,51-5,35	0,001

Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von Proben in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:
 - (a) Gewinnung einer zu untersuchenden Probe;
 - (b) Inkubation der Probe mit einem oder mehreren Molekülen, die spezifisch an sCD40L binden;
 - (c) Nachweisen und/oder quantifizieren von löslichem CD40-Ligand (sCD40L) in der Probe unter Verwendung immunologischer Methoden; und
 - (d) Vergleich des für die zu untersuchende Probe erhaltenen Ergebnisses mit einem Referenzwert und/oder dem Ergebnis einer Referenzprobe.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zu untersuchende Probe und/oder die Referenzprobe aus einem Säugetier, insbesondere aus dem Menschen, stammt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die zu untersuchende Probe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus peripherem Blut oder Fraktionen davon und Zellkultur-Suspensionen oder Fraktionen davon.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die zu untersuchende Probe Blutplasma ist.
5. Verfahren nach Anspruch 3, wobei dem peripheren Blut ein Gerinnungshemmer, insbesondere Heparin, zugesetzt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die an sCD40L bindenden Moleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus anti-sCD40L-Antikörpern oder Teilen davon und sCD40L-Rezeptoren oder Teilen davon.
7. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Antikörper, Teile oder Fragmente davon polyclonale Antikörper, monoklonale Antikörper, Fab-Fragmente, scFv-Fragmente und Diabodies umfassen.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei sCD40L und/oder die an sCD40L bindenden Moleküle in Lösung oder Matrix-immobilisiert vorliegen.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die an sCD40L bindenden Moleküle an eines oder mehrere Nachweisgruppen aus der Gruppe bestehend aus Fluoresceinthioisocyanat, Phycoerythrin, einem Enzym und magnetisches Bead gekoppelt sind.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die an sCD40L bindenden Moleküle mit einem Antikörper, an den eine oder mehrere Nachweismoleküle gekoppelt sind, nachgewiesen werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die immunologischen Verfahren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Sandwich-Enzym-Immuntest, ELISA und Festphasen-Immuntests.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Referenzwert $\leq 4,7 \mu\text{g/l}$ beträgt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die kardiovaskulären Erkrankungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus stabiler und instabiler Angina, Myokardinfarkt, aktuellem Herzsyndrom, koronarer Arterienerkrankung und Herzinsuffizienz.
14. Diagnostischer Kit, umfassend Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Komponenten und/oder Hilfsstoffen.
15. Diagnostischer Kit nach Anspruch 14, umfassend goldmarkierte polyklonale Maus-Indikatorantikörper, biotinylierte polyklonale Nachweisantikörper und eine Testvorrichtung, umfassend ein Fiberglas-Vlies.

16. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose und/oder Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen und/oder zur Überwachung von deren Therapie.
17. Verwendung nach Anspruch 17, wobei die Therapie die Verabreichung von Inhibitoren des Glycoprotein IIb/III-Rezeptors umfaßt.

Fig. 1:

Tool, MI (%)

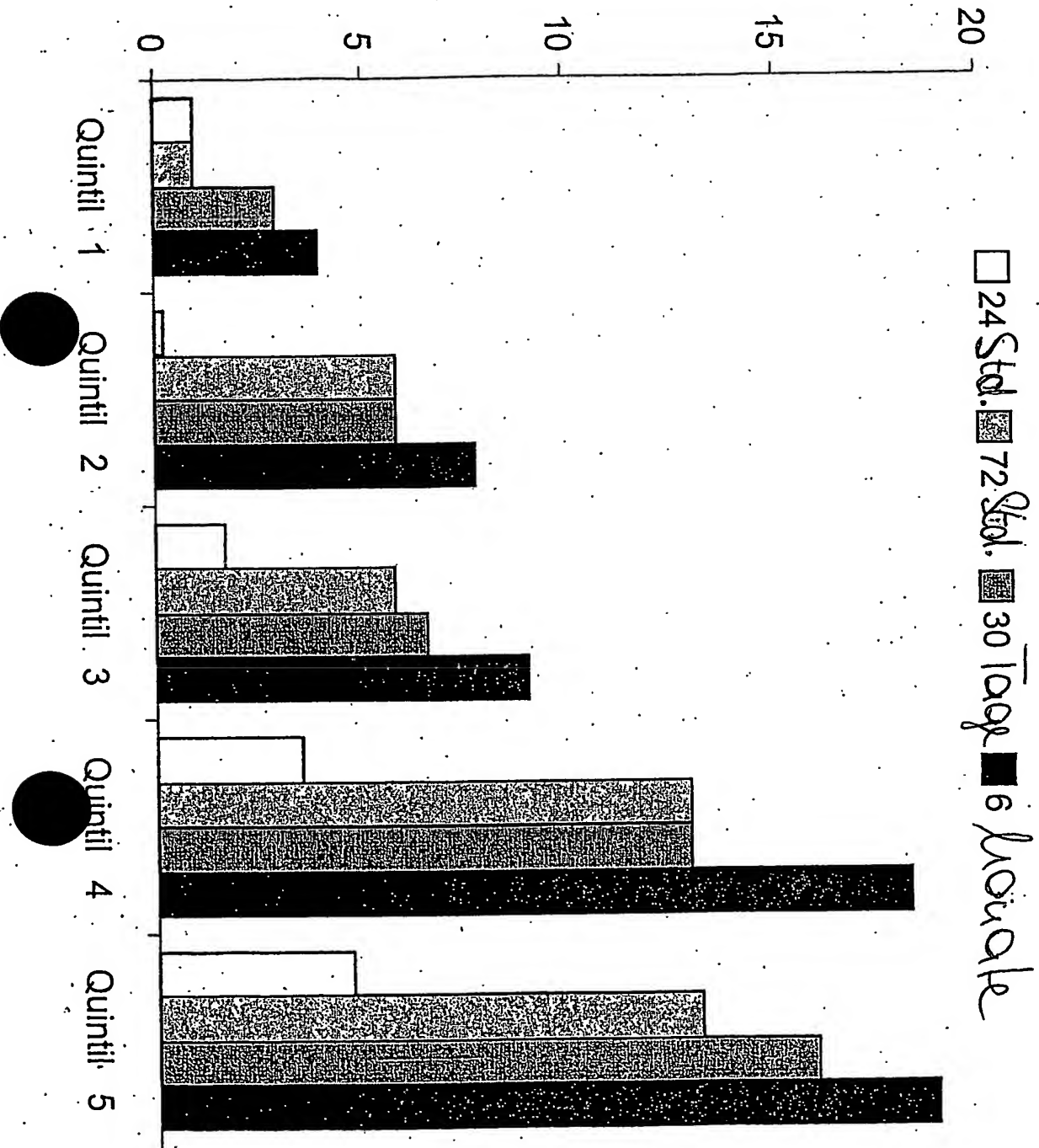
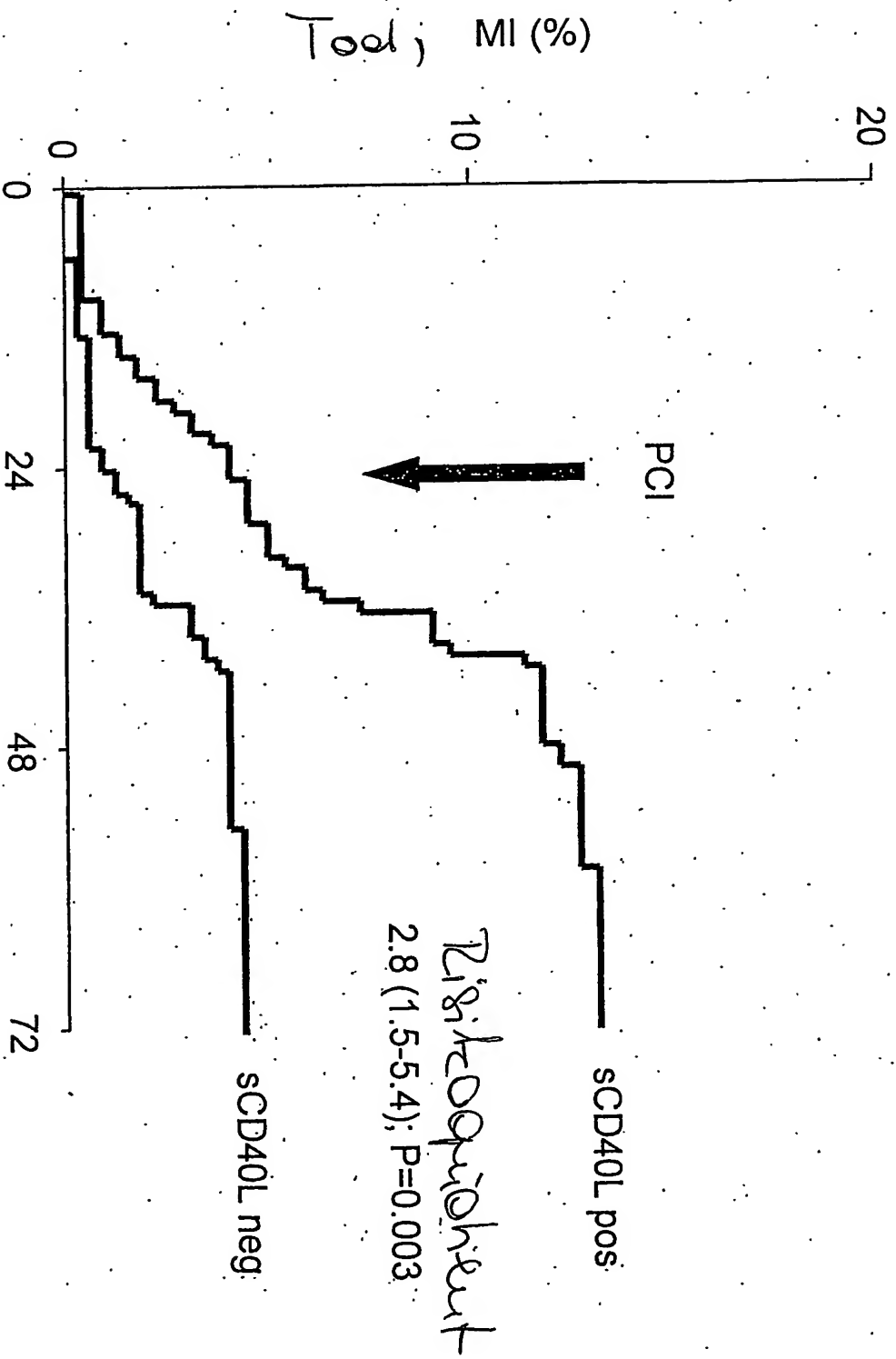


Fig. 2a:



Stüden

Fig. 2b:

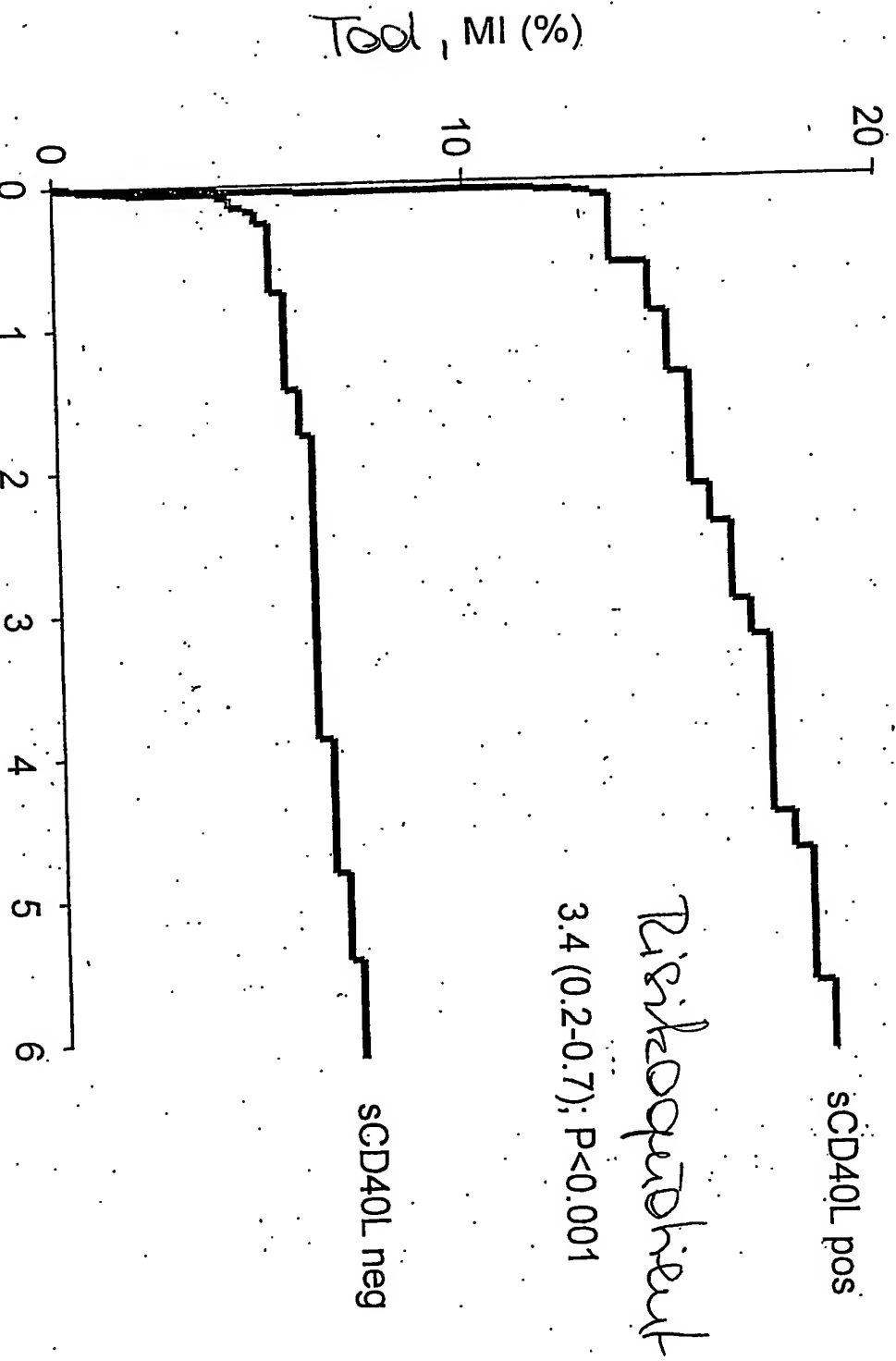


Fig. 3:

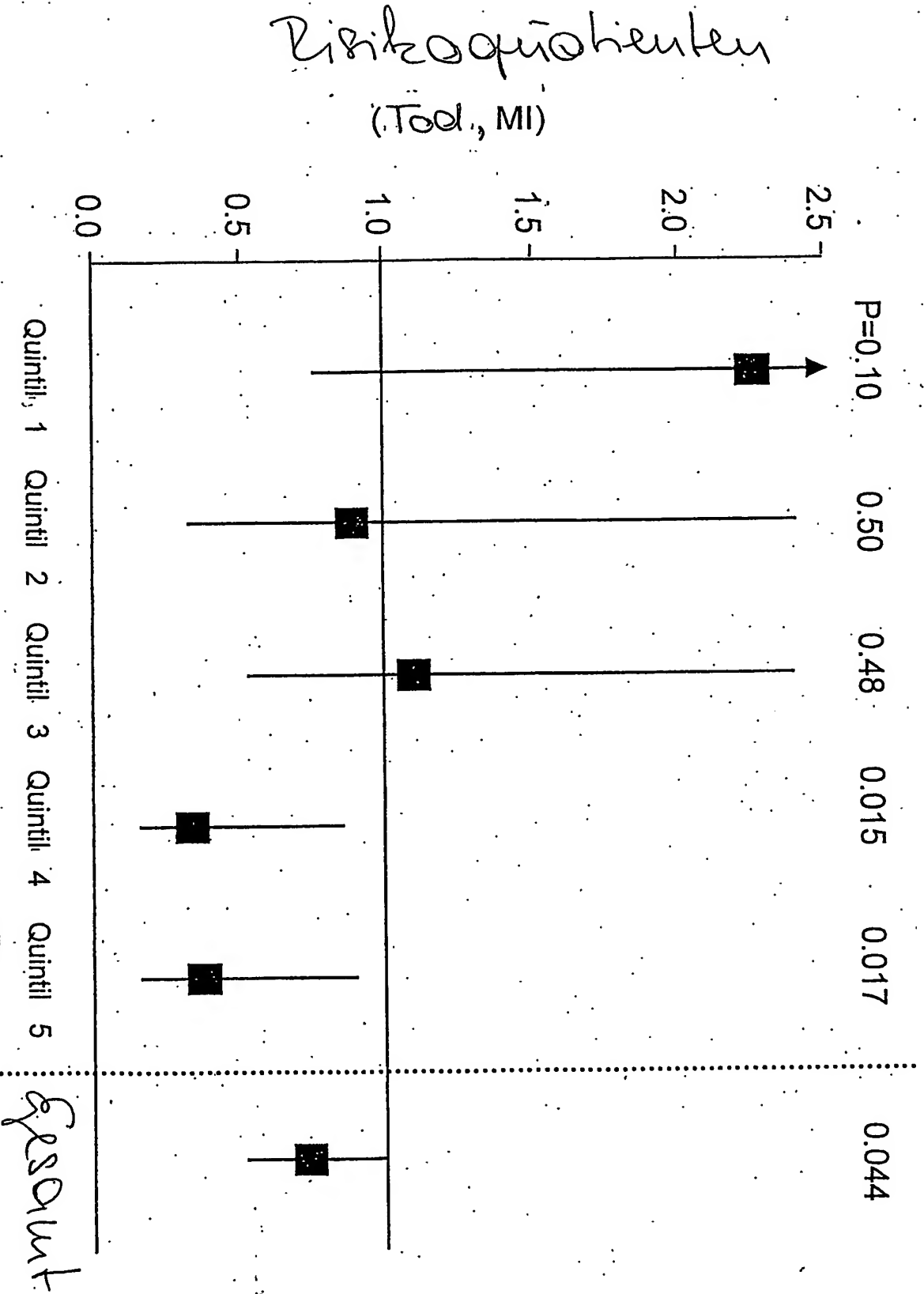
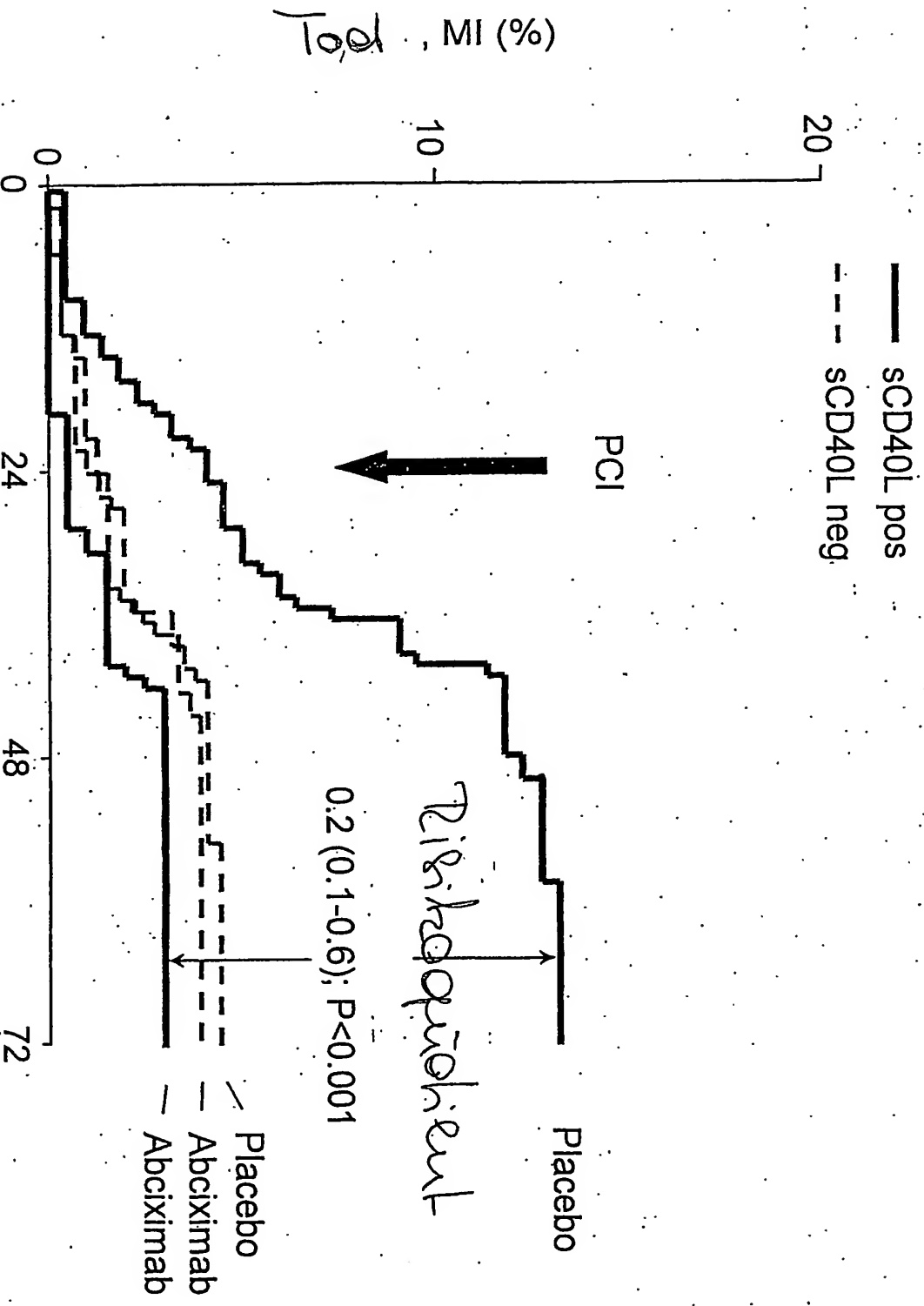
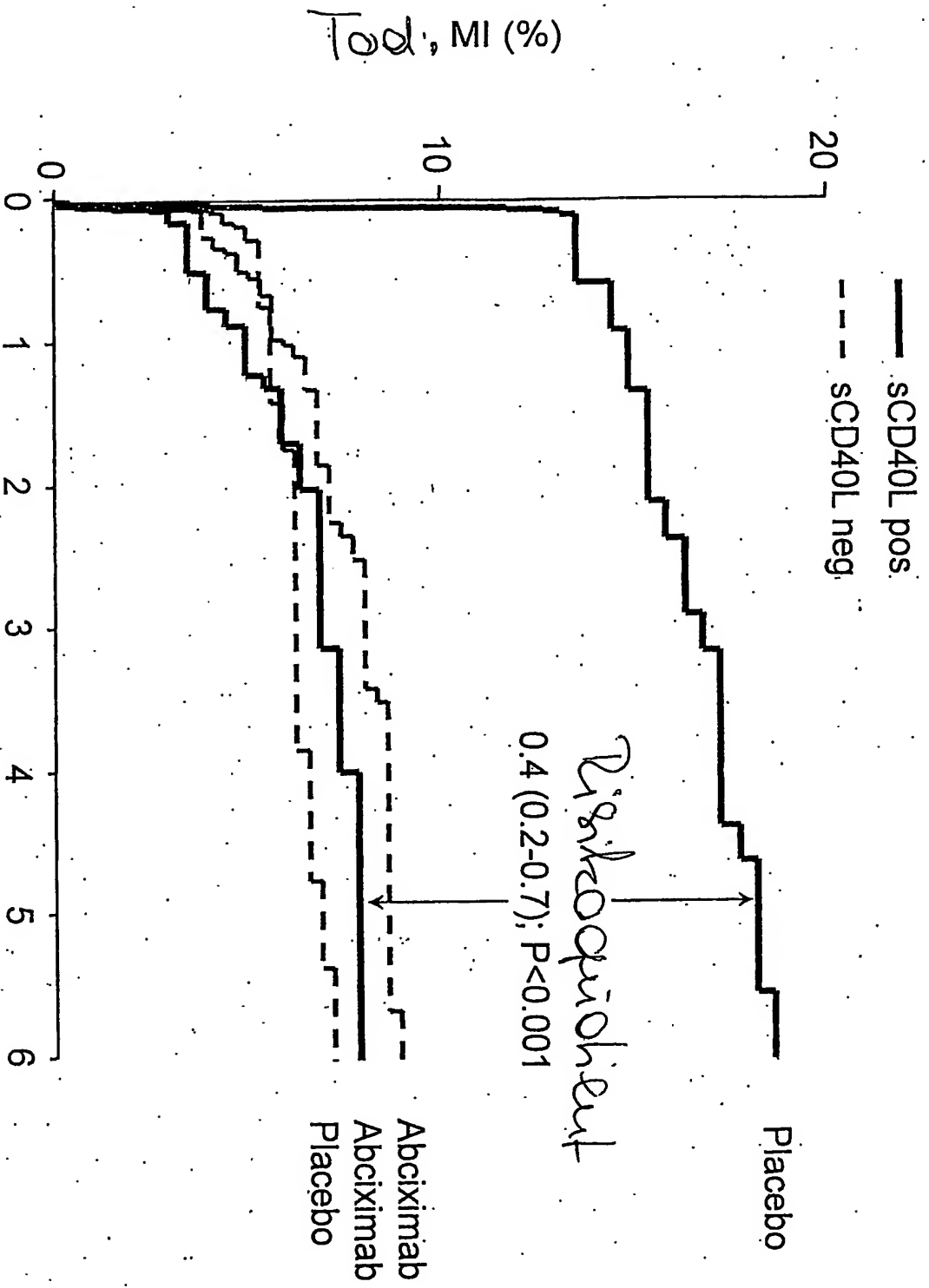


Fig. 4a:



72 81% open

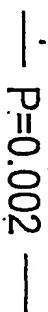
Fig. 4b:



housh

(%)

v.



— P<0.001 —

$$\mathbb{Z}$$

10.

20

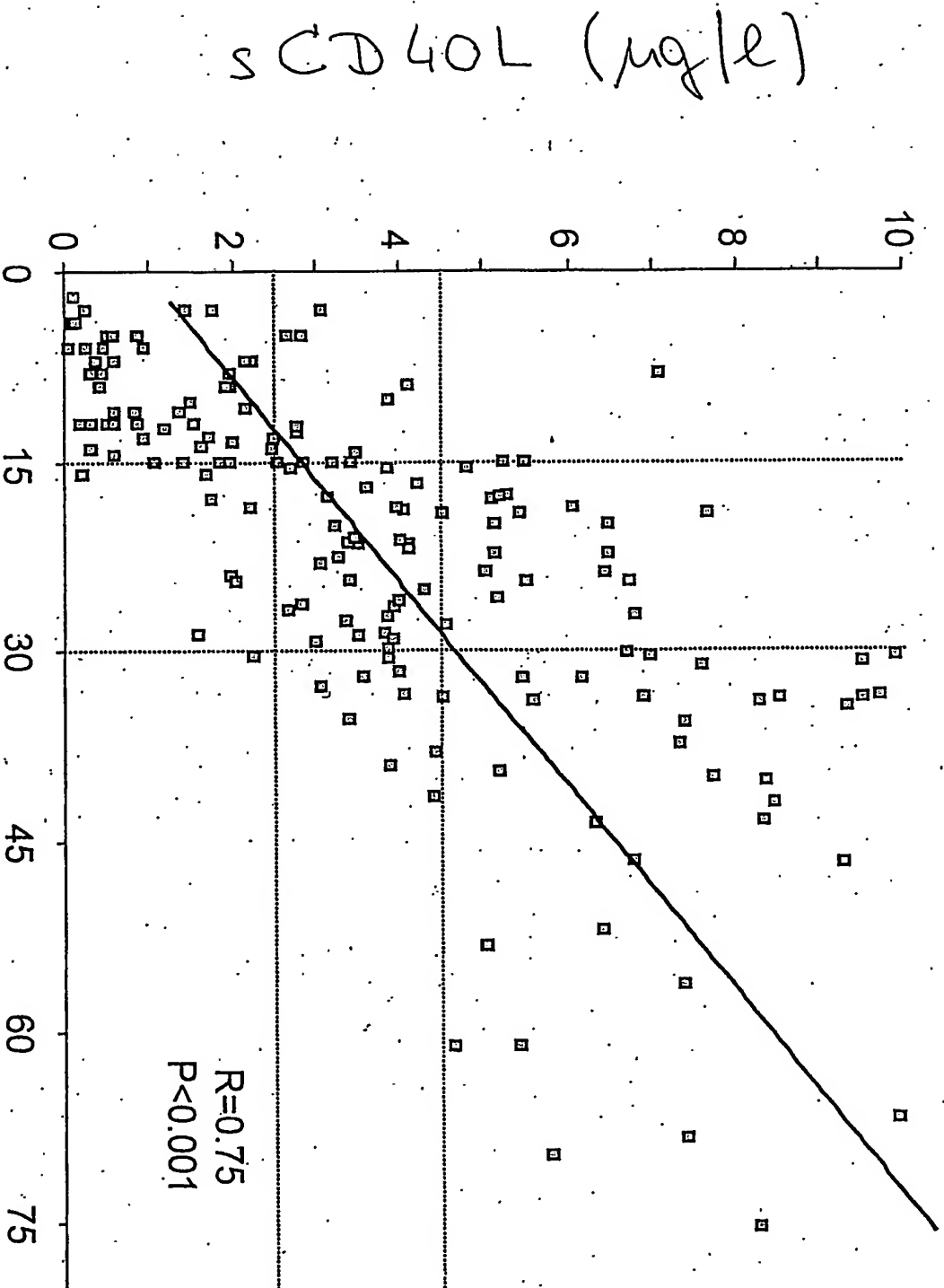
131

keine Kette-
warte -
phlebotomie

Stable
Kardur
Holland.

Shake
Korodot -
S. m. m. m.

Fig. 6:



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.